

Diffusion Restreinte

Rapport d'activités 2004

**Etude génomique
de l'interaction *Hevea* - *Microcyclus ulei***

**Mise en place d'une collaboration avec
l'Université de Santa Cruz (Bahia)**

**GARCIA Dominique
Programme Hévéa
CIRAD-Cultures Pérennes**

**CP- SIC 1803
Janvier 2005**

Remerciements

La mise en place de la collaboration entre le CIRAD et l'UESC est le résultat de deux années d'approche, de connaissance des partenaires, et de travail en commun afin d'aboutir à un projet de recherche reçu favorablement par la FAPESB. Ce travail n'aurait pu se faire sans le soutien financier de Michelin et du MAE, qu'ils en soient remerciés.

Je remercie les équipes de recherche de la CEPLAC-CEPEC et de l'UESC pour leur accueil et leur disponibilité.

Mes remerciements vont aussi à Fabien Doaré et Vincent Le Guen du Cirad en Guyane pour leur collaboration efficace dans la préparation du matériel végétal nécessaire au stage réalisé sur Montpellier.

Enfin, un grand remerciement à l'équipe Biotrop – Cirad pour son accueil et plus particulièrement à Valérie Pujade-Renaud et Agnès Attard pour leurs conseils précieux durant ces deux mois de formation et d'adaptation des protocoles.

Personnes rencontrées

Júlio César de Mattos Cascardo	Professeur	Laboratoire de génomique et expression génique – UESC - Ilhéus
Fabienne Micheli	Chercheur	CIRAD – Laboratoire de génomique et expression génique - UESC - Ilhéus
Abelmon da Silva Gesteira	Post - Doctorant FAPESB	Laboratoire de génomique et expression génique – UESC - Ilhéus
Jose Raimundo Bonadie Marques	Coordinateur Développement	CEPEC – CEPLAC – Itabuna
Adonias de Castro Virgens Filho	Directeur du Sesut	CEPEC – CEPLAC – Itabuna
Uilson Vanderlei Lopes	Directeur	CEPEC – Itabuna
Karina Peres Gramacho	Chercheur	CEPEC – CEPLAC – Itabuna
Edson Lopes Reis	Chercheur	CEPEC – CEPLAC – Itabuna
Lionel Barré	Directeur	Michelin – PMB – Ituberá
Silvio Roberto	Gérant de production et contrôle	Michelin – PMB – Ituberá
Carlos Raimundo Reis Mattos	Chercheur	Michelin – PMB – Ituberá
Marc Seguin	Chercheur	CIRAD – Montpellier – Cultures Pérennes/hévéa
Valérie Pujade-Renaud	Chercheur	CIRAD – Montpellier – Cultures Pérennes/hévéa
Agnès Attard	Chercheur	CIRAD – Montpellier – Cultures Pérennes/hévéa
Franck-Christophe Baurens	Chercheur	CIRAD – Montpellier - Amis
Thierry Legavre	Chercheur	CIRAD – Montpellier - Amis

Chronogramme

Septembre 2003	Demande de soutien financier auprès du MAE pour une étude pilote sur la recherche d'ESTs dans l'interaction hévéa - <i>Microcyclus ulei</i> .
Janvier 2004	Dépôt d'un projet scientifique auprès de la FAPESB sur un appel d'offre de chercheur visitant : Analyse des gènes exprimés dans l'interaction hévéa – <i>Microcyclus ulei</i> . Coordinateur : Prof. Júlio Cascardo (UESC) ; Partenaires : Cirad, Michelin ; Accepté en avril 2004.
4,5 et 6 mai 2004	Séminaire international sur le <i>Microcyclus ulei</i> co-organisé par le CIRAD, Michelin et l'IRRDB.
Du 30/08 au 19/09/2004	Mission de Dominique Garcia à la FAPESB, à la plantation Michelin de Bahia, à l'UESC et à la CEPLAC pour organiser sa nouvelle affectation et initier un plan de travail avec les partenaires Michelin et UESC.
Du 19/09 au 18/11/2004	Formation au CIRAD - Montpellier dans l'équipe Biotrop visant l'adaptation des protocoles pour la construction de banques d'ADNc issus de feuilles d'hévéa.
19/11/2004	Prise de fonction à l'UESC de Dominique Garcia.

Résumé

Faisant suite à une mission à l'UESC en mai 2003, un projet de recherche sur l'analyse des séquences exprimées dans l'interaction *Hevea* - *Microcyclus* a été élaboré à partir de septembre 2003. Toutefois, compte tenu du gros investissement en moyens humains, matériels et financiers consentis depuis 12 ans sur la thématique Maladie sud Américaine des feuilles, ni le CIRAD, ni Michelin n'étaient d'avis d'ouvrir une nouvelle voie de recherche aussi prometteuse fut-elle, si les pays intéressés par cette thématique ne participaient pas à cet effort de recherche.

C'est dans ce contexte que le projet a été déposé auprès de la FAPESB pour un poste de chercheur visitant à l'UESC. Il a été accepté et bénéficie pour un an du soutien financier de ce fond d'aide à la recherche brésilien.

Avec le soutien financier du MAE et l'appui technique du laboratoire Cirad-Biotrop (Montpellier), une étude pilote sur le couple hévéa - *Microcyclus ulei* allant jusqu'au clonage d'ADNc a permis d'adapter les protocoles à l'hévéa pour les premières phases de l'étude visant la construction de banques d'ADNc.

Depuis novembre 2004, Dominique Garcia, chercheur du programme hévéa, en poste dans le Mato Grosso depuis 5 ans sur le programme Cirad – Michelin – Brésil d'amélioration variétal de l'hévéa, a été affecté pour 3 ans à l'UESC pour conduire ce projet.

Cette première étape de création et de caractérisation de banques d'ADNc associés à la résistance à *Microcyclus ulei* devra déboucher sur des études de fonctionnalité des gènes d'intérêt, sur le transfert des résultats vers la sélection assistée par marqueurs moléculaires. Enfin, d'une manière globale, ces résultats contribueront au développement d'un pôle de biotechnologie pour des études d'interactions hôte-parasite dans l'Etat de Bahia. Allant dans ce sens, ce rapport fait aussi état d'une demande forte du CEPLAC-CEPEC pour développer en partenariat avec le CIRAD et Michelin des approches complémentaires en matière de biologie moléculaire sur hévéa et *Microcyclus*.

Mots clés

Hevea, *Microcyclus ulei*, biologie moléculaire, génomique, expressed sequence tags, cartographie moléculaire.

Abréviations

CEPLAC	: Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira
CEPEC	: Centro de Pesquisas do Cacau
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
ESTs	: Expressed Sequence Tags
FAPESB	: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
PCR	: Polymerase Chain Reaction
QTL	: Quantitative Trait Locus
RT	: Reverse Transcriptase
UESC	: Universidade Estadual de Santa Cruz

Sommaire

Remerciements	i
Personnes rencontrées	ii
Chronogramme	iii
Résumé	iv
Introduction.....	1
1 Projet d'analyse des gènes exprimés dans l'interaction hévéa- <i>Microcyclus</i>	1
1.1 Introduction	1
1.2 Matériel étudié et méthodes mises au point au cours du stage à Biotrop	2
1.2.1 Matériel végétal.....	2
1.2.2 Extraction des ARN.....	2
1.2.3 Les banques	5
1.3 Matériel et méthodes pour les études menées à l'UESC	6
1.3.1 Matériel végétal.....	6
1.3.2 Matériel fongique	6
1.3.3 Echantillonnage	7
1.3.4 Extraction	7
1.3.5 Construction des banques	7
1.3.6 Séquençage.....	7
1.3.7 Analyses bioinformatiques	7
1.4 Stage en bioinformatique	8
1.5 Les résultats espérés	8
1.6 Partenaires.....	8
2 Sollicitations de la CEPLAC pour initier des études complémentaires sur le couple hévéa – <i>Microcyclus</i>	10
2.1 Génotypage.....	10
2.2 Cartographie moléculaire et recherche de QTLs sur des descendances issues de croisements avec P10 (<i>Hevea pauciflora</i>).....	10
2.3 Diversité génétique de souches de <i>Microcyclus ulei</i>	12
2.4 Epidémiologie de la maladie Sud - Américaine des feuilles	12
Conclusion.....	13
Bibliographie.....	14

Introduction

L'Etat de Bahia est le troisième producteur de caoutchouc naturel du Brésil avec 10.700 tonnes de caoutchouc sec par an (12,5 % de la production nationale) et possède aussi la troisième surface hévéicole avec 21.774 ha. Jusqu'en 2002, la politique de libre échange préconise commerce stimulée par le gouvernement, la réduction des prix sur le marché international et l'absence d'encouragement pour investir dans cette culture ont provoqué une stagnation du secteur primaire. L'une des principales causes de ce désintérêt progressif pour l'hévéaculture dans l'Etat de Bahia reste cependant la présence de la maladie Sud-Américaine des feuilles, provoquée par *Microcyclus ulei*. Les plantations d'hévéa réalisées dans l'Etat de Bahia jusqu'en 1970, sont aujourd'hui sévèrement endommagées en raison de la forte sensibilité à *Microcyclus ulei* des clones utilisés. Il faut toutefois souligner qu'à l'époque, l'état des connaissances scientifiques ne permettait pas la mise au point d'un programme de sélection rigoureux pouvant donner des garanties sur la durabilité de la résistance génétique de l'hévéa à ce champignon.

Actuellement, l'état des vieilles plantations et l'absence de nouvelles plantations indiquent qu'il y aura une forte réduction de l'offre en caoutchouc naturel, compromettant la survie de ce secteur à moyen terme (Castro Filho, 2003). Par contre, des projections sur le marché du caoutchouc indiquent une augmentation de la consommation interne qui va générer un déséquilibre entre l'offre et la demande. Dans ce contexte, le secteur privé a déjà formulé une demande pour une politique de réactivation du secteur du caoutchouc au travers d'un document, le PRODEAB (Programa de Desenvolvimento do Agronegócio Borracha no Estado da Bahia). Ce programme prévoit l'implantation de 10.000 hectares d'hévéa dans l'Etat de Bahia et comprend la mise en place d'infrastructures pour la production de plants, la fixation des populations, des plantations utilisant l'hévéa en association avec le cacao et en monoculture. De nouveaux clones provenant des sélections de la CEPLAC et des sélections Michelin en collaboration avec le CIRAD sont proposés pour les nouveaux plantings.

1 Projet d'analyse des gènes exprimés dans l'interaction hévéa- *Microcyclus*

1.1 Introduction

La grande diversité du pouvoir pathogène du parasite accroît le risque d'un contournement des résistances génétiques des clones utilisés. Différentes actions ont déjà été engagées pour réduire ce risque, parmi lesquelles la mise en place d'un réseau multilocal de champs de clones permettant de vérifier dans des environnements épidémiologiques différents la durabilité des résistances (Garcia, 2003).

Diverses approches mettant en œuvre des techniques de biologie moléculaire ont aussi été développées (Besse et al., 1994 ; Lespinasse et al., 2000) et sont poursuivies au CIRAD afin d'identifier les macro régions du génome (QTLs) de l'hévéa impliquées dans la résistance à *Microcyclus ulei* (Le Guen et al., 2003). Trois descendance impliquant des résistances originales (résistance totale, résistance partielle, résistance contournée) sont en cours d'étude. Sur une descendance issue d'un croisement avec

un parent résistance d'origine *Hevea benthamiana*, deux QTL majeurs ont été identifiés à la fois en conditions contrôlées et au champ. Au-delà de l'identification de ces macro régions, un travail méthodologique est entrepris pour se rapprocher des gènes de résistance.

La recherche des séquences exprimées d'ADN ou ESTs (Expressed Sequence Tags) au cours de l'interaction hévéa - *Microcyclus* est une façon de connaître les gènes (et non plus des macro-fragments neutres) impliqués dans la résistance. Les ESTs sont des séquences anonymes ou de fonction connue, issues du séquençage systématique d'ADN complémentaires (obtenus à partir des ARN messagers correspondant à des situations physiologiques bien précises). Ces ESTs sont représentatives du profil d'expression des gènes et peuvent être comparées aux banques de données publiques afin de déterminer par analogie de séquence la fonction des gènes correspondants. Cette démarche viendrait en complément de la recherche de QTLs pour mettre en évidence de nouveaux marqueurs de la résistance et pour identifier les mécanismes de résistance associés aux QTLs déjà connus.

Le laboratoire de génomique et expression génique de l'université de Santa Cruz (Ilhéus) dirigé par Júlio Cascardo, développe depuis septembre 2002 avec l'appui de Fabienne Micheli (CIRAD Cultures Pérennes, programme cacao) et Abelmon Gesteira (Post – doctorant Fapesb) un projet de recherche d'ESTs sur l'interaction Cacao - *Crinipellis pernicioso* (balai de sorcière). Le travail réalisé en 2003-2004 avec l'appui du MAE a eu pour objectif le démarrage d'une étude des séquences d'ADN exprimées au cours de l'interaction hévéa- *Microcyclus ulei*.

1.2 Matériel étudié et méthodes mises au point au cours du stage à Biotrop

Afin de faciliter mon intégration dans le laboratoire de génomique de l'UESC, un stage de 2 mois a été organisé au CIRAD – Biotrop afin de mettre au point les techniques d'extraction d'ARN et de construction de banques de d'ADNc à partir de feuilles d'hévéa.

1.2.1 Matériel végétal

Des échantillons de matériel végétal sain et infecté par *Microcyclus ulei* ont été préparés en Guyane, immergé dans un conservateur (RNAlater) puis envoyé par courrier rapide au laboratoire Biotrop. Les génotypes MDF 180 et PB 260 ont été inoculés avec une souche de *Microcyclus ulei*. Les feuilles témoins ont été traitées avec de l'eau. Les temps de prélèvement (12, 24, 48, 96 heures et 10 jours) couvrent la période de pénétration du champignon jusqu'à l'émission de conidiophores.

Des feuilles fraîches d'hévéa (clone PB 260) ont été prélevées dans les serres du CIRAD (Montpellier).

1.2.2 Extraction des ARN

Les échantillons (50 à 100 mg) sont broyés dans un broyeur automatique à billes de verre ou de métal. Au préalable, le RNAlater doit être éliminé complètement par

centrifugation ou lyophilisation pour éviter la formation de glace qui compromet le broyage.

Deux méthodes d'extraction ont été testées : MATAB et TRIzol. La méthode TRIzol permet d'extraire des ARN de bonne qualité à partir de matériel frais (photo 1). Par contre, pour les échantillons conservés dans le RNAlater, la précipitation des acides nucléiques est plus aléatoire en raison d'interférences entre le RNAlater et le TRIzol (photo 2). La méthode MATAB donne des résultats d'extraction plus homogène (photo 1 et 3), toutefois cette méthode laisse des contaminants qui bloquent la reverse transcription.

Photo 1 : ARN extrait au MATAB et au TRIzol à partir de feuilles d'hévéa fraîches

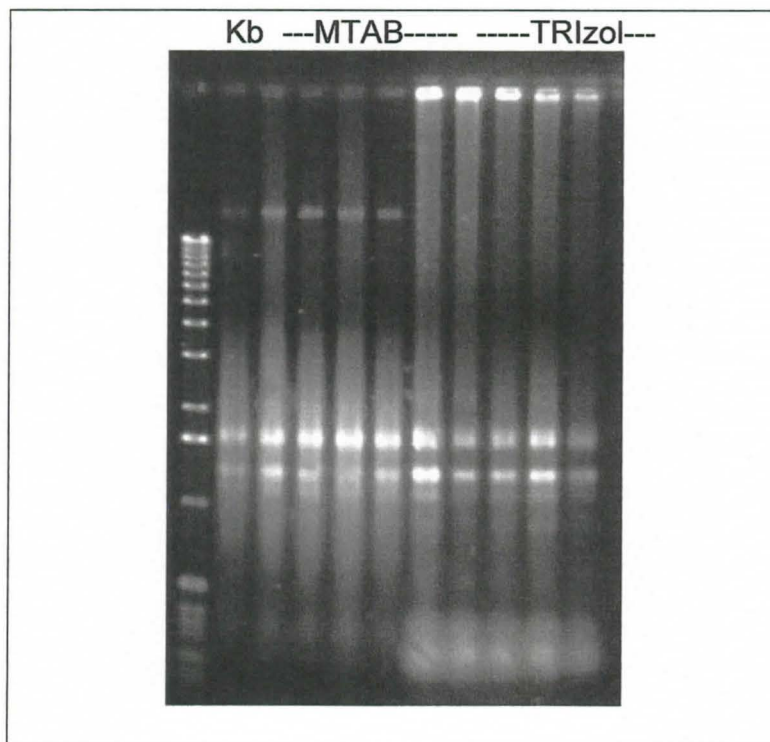


Photo 2 : ARN extrait au TRIzol à partir de feuilles d'hévéa conservées dans le RNAlater

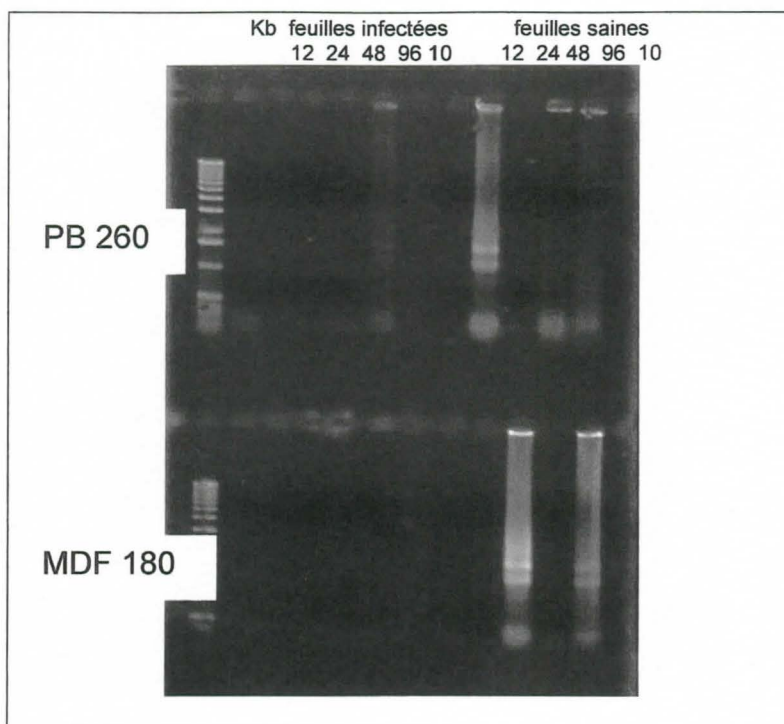
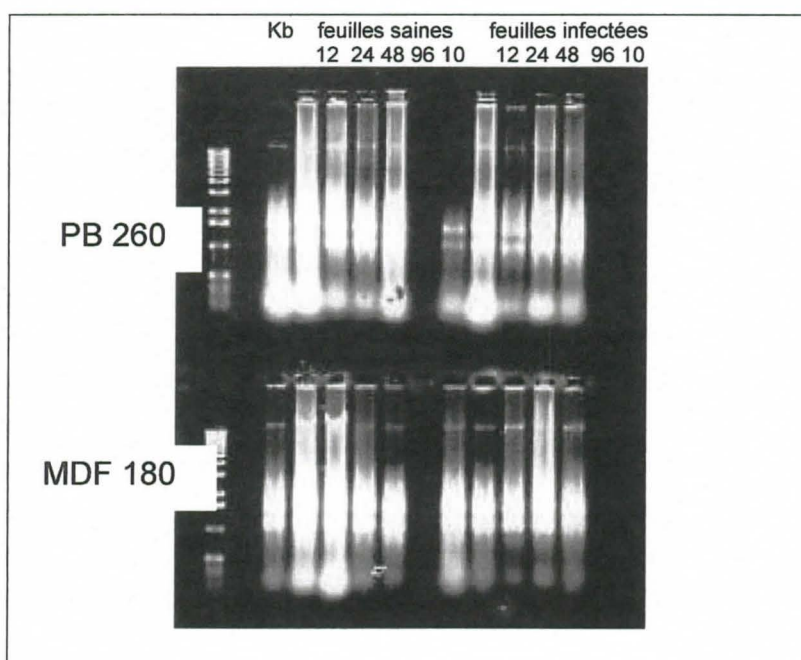


Photo 3 : ARN extrait au MATAB à partir de feuilles d'hévéa conservées dans le RNAlater



1.2.3 Les banques

Les banques ont été réalisées suivant deux protocoles :

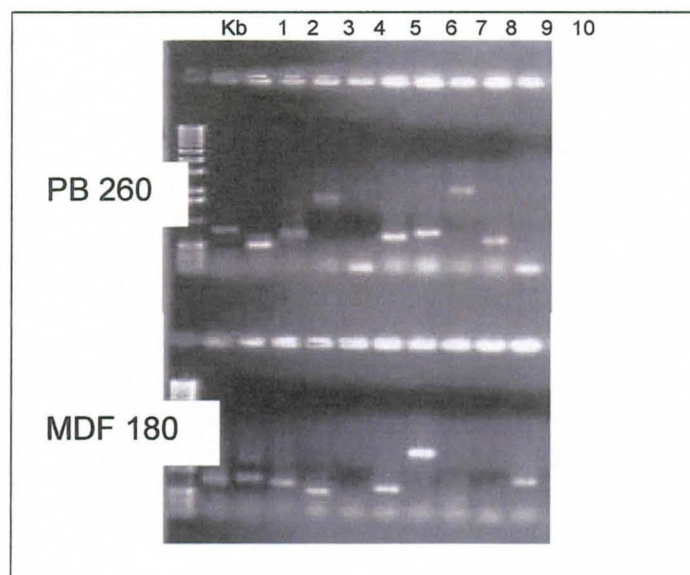
- Le premier pour créer deux banques **non orientées** dans le vecteur pGEMT-easy (Promega) utilisant le kit « BD SMART™ PCR cDNA synthesis » (Clontech). Pour chaque génotype infecté, les extraits ARN (MATAB) de chaque point de la cinétique ont été regroupés de façon stœchiométrique.
- Le deuxième pour créer une banque **orientée** dans le vecteur pDNR-LIB, à partir des échantillons d'ARN disponibles issus de la méthode TRIzol, soit seulement deux points de la cinétique de PB 260 sain en utilisant le kit « Creator™ SMART™ cDNA library construction » (Clontech). Cette banque a été faite dans un but de formation.

En annexe 1, on trouvera le protocole détaillé pour réaliser des banques orientées en utilisant le kit « Creator™ SMART™ cDNA library construction » (Clontech). C'est le type de banque qui est construite à l'UESC afin d'être plus efficace au moment du séquençage.

Concernant les banques non orientées dans le vecteur pGEMT-easy, le titre des banques est faible puisque pour MDF 180 et PB 260, nous avons obtenu 86 (30 %) et 17 (14 %) colonies transformées. En théorie, en utilisant toute la solution bactérienne (1ml) et tout l'extrait de ligation (10 µl) une banque de 2 580 colonies pourrait être obtenue pour MDF 180 et 510 colonies pour PB 260. Il faudra donc chercher à améliorer ces rendements en jouant sur la qualité des ARN et sur les conditions de ligation.

L'amplification PCR à partir d'un échantillon de colonies bactériennes supposées transformées par des plasmides recombinants montre sur la photo 4 que pour le génotype PB 260, 8 colonies sur 10 détiennent un plasmide recombiné avec un ADNc de longueur comprise entre 0.5 Kb et 2 Kb. Pour le génotype MDF 180, 7 colonies sur 10 détiennent un plasmide recombiné avec un cDNA de longueur comprise entre 0.5 Kb et 1.6 Kb

Photo 4 : Amplification PCR d'un échantillon de colonies transformées avec des plasmides recombinant pour les génotypes PB 260 et MDF 180 infectés.



1.3 Matériel et méthodes pour les études menées à l'UESC

1.3.1 Matériel végétal

Deux clones sont étudiés : MDF 180 à résistance partielle stable et PB 314 sensible. Le matériel greffé est maintenu en pépinière couverte sur la station de recherche de la plantation Michelin de Bahia.

1.3.2 Matériel fongique

Trois souches ont été sélectionnées pour leur profil complémentaire de virulence (tableau 1). Ces souches sont entretenues sur clones sensibles et inoculées de façon séparée à la concentration de 2.10^5 spores/ml.

Tableau 1 : Souches sélectionnées pour réaliser les motifs infectés

Isolat	Fx 3864	Fx 985	FX 2261	FX 4098	MDF 180	PA 31	IAN 3087	IAN 717	Fx 3899	Fx 2784	FX 2804	IAN 6158	VIR
Hevea	bras.	bras.	bras.	bras.	bras.	pauc.	benth.	benth.	benth.	benth.	benth.	benth.	
FTP 22	S 5	R 1	R 1	R 1	S 4	S 3	R 1	S 3	R 1	R 1	R 1	R 1	4
FTP 19	S 6	S 6	R 1	S 4	S 5	S 4	S 6	R 1	R 1	R 1	R 1	R 1	6
FTP 13	S 5	S 3	S 4	S 3	S 4	S 3	S 6	S 5	S 4	R 2	S 5	S 6	11

1.3.3 Echantillonnage

Les temps de prélèvement après inoculation couvrent toutes les phases de développement du cycle du champignon : pénétration (6, 12, 24 heures) ; développement interne (48, 72, 96 heures) ; conidiogénèse (10, 16, 22, 28, 34 jours) et ascogénèse (40, 46, 52, 58 jours) (Sambugaro *et al.*, 2004).

Des échantillons de champignon cultivé *in vitro* et de conidies émises à la surface des feuilles seront aussi prélevés afin de différencier les séquences provenant du matériel végétal de celles provenant du champignon.

1.3.4 Extraction

Compte tenu des résultats obtenus au cours du stage à Biotrop (§ 1.2.2), les extractions d'ARN seront réalisées au TRIzol sur des échantillons conservés dans l'azote liquide puis à - 80°C.

1.3.5 Construction des banques

A partir des extraits issus du matériel végétal résistant, sensible, sain et infecté, ainsi que du champignon, cinq banques orientées dans le vecteur pDNR-LIB seront créées en utilisant le kit « Creator™ SMART™ cDNA library construction » (Clontech).

La prévision est d'obtenir 4000 séquences pour chaque banque.

1.3.6 Séquençage

Le séquençage sera réalisé à l'UESC avec un séquenceur capillaire Megabace1000.

1.3.7 Analyses bioinformatiques

Les analyses bioinformatiques suivront les étapes suivantes :

1. traitement des données pour l'obtention de la séquence de chaque ESTs (soumission et analyse par PHRED (Ewing *et al.*, 1998) ;
2. comparaison des ESTs avec des banques de données publiques (Genbank nr) et avec des données encore non publiées (séquences du génome de *Crinipellis perniciosa* et du projet « interaction cacao/*C. perniciosa*), avec un objectif d'identifier la fonction possible de chaque ESTs ;
3. pour séparer entre les séquences de la plante et du champignon, on utilisera la banque de d'ADNc créée pour *Microcyclus ulei* et le script basé sur le pourcentage de codon GC qui permet de différencier les deux types d'organisme ;
4. les gènes non identifiés par homologie avec des séquences issues de banques de données, seront analysés avec d'autres programmes d'analyses (PFAM, PRODOM) ;
5. organisation des ESTs en groupes fonctionnels ;
6. comparaison des séquences/des groupes fonctionnels obtenus dans chaque bibliothèque.

1.4 Stage en bioinformatique

Ce stage organisé par l'INRA, le CIRAD et l'ENSAM s'est déroulé du 4 au 8 octobre 2004.

Les objectifs en étaient :

- l'apprentissage des outils de bioinformatique les plus classiques pour rechercher, comparer ou analyser des séquences connues ou inconnues ;
- la compréhension des principes sur lesquels ces analyses de séquences sont basées afin de pouvoir réaliser une analyse critique des résultats obtenus ;
- l'identification des meilleures stratégies pour résoudre les problèmes les plus courants rencontrés par les utilisateurs.

Cette formation visait à donner les éléments nécessaires aux participants pour réaliser de façon autonome les traitements de séquence les plus courants. La formation a donc privilégié les travaux dirigés sur ordinateur et réduit au strict nécessaire les aspects théoriques. Le programme détaillé est donné en annexe 2.

1.5 Les résultats espérés

Les résultats espérés des travaux menés à l'UESC sont :

- la construction de 5 banques d'ADNc ;
- le séquençage de 18 000 ESTs ;
- l'obtention de groupes fonctionnels de gènes dans chaque banque ;
- l'obtention de gènes différentiellement exprimés entre plantes sensibles et résistantes ;
- l'identification de gènes de champignon impliqués dans la virulence.

Les répercussions et/ou l'impact des résultats seront :

- l'obtention de la première banque d'ESTs pour l'interaction *Hevea* – *Microcyclus ulei* ;
- l'identification de gènes impliqués dans cette interaction ;
- l'utilisation des gènes d'intérêt dans de futures études fonctionnelles ;
- l'utilisation de ces gènes dans la sélection assistée par marqueur moléculaire (SAM) ;
- l'orientation d'au moins un étudiant en mestrado et de deux étudiants en initiation scientifique.

1.6 Partenaires

Ce projet a officiellement débuté le 1^{er} septembre 2004, date de la signature du contrat de chercheur visitant avec la **Fapesb** à Salvador.

Ce projet a comme partenaire les **Plantations Michelin de Bahia** qui mettent à disposition leur laboratoire et leur pépinière pour la préparation du matériel végétal

infecté et sain. A partir de 2005, un soutien financier a été demandé à ce partenaire pour couvrir une partie des dépenses de fonctionnement.

L'Université Estadual de Santa Cruz accueille le chercheur dans ses locaux et met à disposition le matériel du laboratoire de génomique et expression génique et le réseau informatique pour l'analyse bioinformatique des séquences.

Le **Ministère des Affaires Etrangères** vient soutenir des actions qui permettent de consolider le partenariat entre le CIRAD et l'UESC et aider à la création d'un pôle de génomique dans la région Nord-Est du Brésil (formations d'étudiants en vue de transfert de technologie, missions de rencontre et d'échanges pour construire et renforcer les partenariats).

2 Sollicitations de la CEPLAC pour initier des études complémentaires sur le couple hévéa – *Microcyclus*

Suite au workshop sur le *Microcyclus ulei*, la CEPLAC–CEPEC a sollicité le CIRAD et Michelin pour développer en commun des axes de recherche concernant le SALB. Au cours de ces réunions, il avait été demandé à Uilson Vanderlei Lopes et Jose Raimundo Bonadie Marques de formuler plus précisément leur demande par la rédaction d'un projet de recherche. Aucune proposition construite n'a été reçue jusqu'à ce jour. Toutefois, profitant de mon passage en septembre 2004 à Ilhéus, accompagné de Carlos Mattos, Lionel Barré et Sylvio Roberto nous avons visité les laboratoires de la CEPLAC et discuté des thématiques concernant le SALB sur lesquelles la CEPLAC souhaiterait travailler.

On se réfèrera au rapport de Didier Clément (Rapport de mission au Brésil, Département Cultures Pérennes / programme cacao, n°1680) pour connaître les structures de laboratoire de la CEPLAC.

2.1 Génotypage

Au sein d'une population d'*Hevea pauciflora*, Bonadie souhaiterait connaître les distances génétiques entre génotypes afin de sélectionner les plus différents et les introduire dans des croisements. Une des limitations à cette étude est le faible nombre de génotypes non apparentés chez *Hevea pauciflora* puisqu'on connaît seulement deux génotypes : PA31 et P10.

Par contre, il existe de nombreux génotypes issus de croisements entre clones asiatiques et P10. On dénombre 82 génotypes dans le germoplasme présent à PMB, 970 génotypes issus des croisements CMB, une centaine issue de deux croisements CEPLAC. Personnellement, je ne vois pas trop l'intérêt de connaître les indices de différenciation sur ces populations fortement apparentés. Par contre, compte tenu des effectifs importants pour quelques descendance, des études de cartographie sont réalisables pour identifier des QTLs de résistance au SALB d'origine *pauciflora*.

2.2 Cartographie moléculaire et recherche de QTLs sur des descendance issues de croisements avec P10 (*Hevea pauciflora*)

Trois descendance sont aujourd'hui en cours d'étude au CIRAD. Ces descendance ont les caractéristiques suivantes :

- la première descendance est issue d'un croisement entre *Hevea brasiliensis* (sensible et producteur, PB 260) et *Hevea benthamiana* (résistant et peu producteur, Fx 3899). Différents QTLs associés à la résistance ont été identifiés, toutefois ils ne sont pas suffisants car la résistance à Fx 3899 est déjà connue comme contournée dans l'état de Bahia (Lepinasse et al., 2000 a,b ; Le Guen et al., 2003) ;
- la deuxième en cours d'étude provient d'un croisement entre deux parents *Hevea brasiliensis* dont un posséderait une résistance monogénique comme le montre la ségrégation dans la descendance du caractère de résistance ;
- la troisième en cours d'étude fait intervenir deux parents *Hevea brasiliensis* dont un possède une résistance partielle très stable.

L'absence de connaissance sur le déterminisme génétique des résistances issues d'*Hevea pauciflora* associée au fait que nous disposons de plusieurs descendance avec des effectifs importants, issues de P10 (tableau 2) permet d'envisager le montage d'un projet de recherche en collaboration (CEPEC – UESC – Michelin – Cirad). Cette collaboration pourrait bénéficier de l'appui local de Didier Clément et du soutien sur Montpellier de Marc Seguin. Du côté du CIRAD, il n'est toutefois pas envisagé de commencer dans l'immédiat une collaboration sur cette thématique pour différentes raisons : dont l'arrivée récente à la CEPEC et l'UESC de D. Clément (sur cacao / cartographie) et D. Garcia (sur hévéa / ESTs) qui doivent intégrer de nouvelles équipes et mettre en route leur propre thématique.

Tableau 2 : Descendances issues du génotype P10 (*Hevea pauciflora*) provenant de croisements CMB.

Croisements	Généalogie des descendants	Nombre de plants
PB 235 x FDR 4151	PB 235 x [RRIM 600 x (P10 x PB 86)]	201
PB 260 x FDR 4151	PB 260 x -	50
GT1 x FDR 4151	GT1 x -	10
IRCA 130 x FDR 5465	IRCA 130 x [RRIM 600 x (P10 x PB 86)]	73
PB 260 x FDR 5465	PB 260 x -	143
Fx 3864 x FDR 5482	Fx 3864 x [RRIM 600 x (P10 x PB 86)]	7
PB 235 x FDR 5643	PB 235 x [RRIM 600 x (P10 x PB 86)]	25
PB 260 x FDR 5643	PB 260 x -	218
PR 255 x FDR 5643	PR 255 x -	72
XX 701 x FDR 5643	XX 701 x -	2
CDC 429 x FDR 5643	CDC 429 x -	1
GT1 x FDR 5643	GT1 x -	70
PB 310 x FDR 5643	PB 310 x -	29
RRIM 600 x FDR 5643	RRIM 600 x -	22
RO 38 x FDR 5643	RO 38 x -	2
GT1 x CD 2126	GT1 [(P10 x PB 86) x MDF 38]	45

Pour avis, il sera toutefois demandé à Marc Seguin et Didier Clément de se prononcer sur le choix des descendances à étudier. Quatre descendances présentent des effectifs importants. Leur fonds de résistance est fourni par quatre plein-frères issus du croisement entre RRIM 600 et un descendant direct de P10. Ces 4 descendances peuvent-elles faire l'objet de l'étude ? Dans l'affirmative, doit-on conserver la totalité des individus pour chaque descendance ?

2.3 Diversité génétique de souches de *Microcyclus ulei*

Suite au travail préliminaire développé en Guyane sur la caractérisation de marqueurs microsatellites polymorphes (Le Guen et *al.*, 2004), au cours du workshop *Microcyclus*, un groupe constitué de chercheurs du CIRAD (Garcia, Guyot, Le Guen), Michelin (Mattos), UNESP (Furtado, Sambugaro) et CEPEC (Gramacho, Lopes) avait analysé la possibilité de développer des études de diversité génétique d'isolats de *Microcyclus* prélevés au Brésil.

Après une formation en biologie moléculaire préliminaire en France ou en Guyane de Rosana Sambugaro en 2^{ème} année de Doctorat, il était prévu que celle-ci rejoigne l'équipe de Karina Gramacho à la CEPLAC. Un projet de recherche devait être rédigé par E. Furtado et Rosana Sambugaro. A partir de ce projet une demande de formation DESI aurait été faite pour assurer l'accueil et la formation de Rosana. A ce jour, aucun projet n'a été reçu, par contre des contacts ont été établis entre Karina Gramacho et Rosana Sambugaro. Karina se propose d'assurer la formation de Rosana pendant un mois. Pour cela, elle sollicite l'appui financier de Michelin pour couvrir les dépenses de produits (5000 reais).

Compte tenu des échéances proches de fin de doctorat de Rosana, il est fort probable que cette étude de diversité ne représentera qu'une étude préliminaire sur un nombre limité de souches géographiquement peu diversifiées. Les premiers résultats obtenus au CEPEC permettraient de déposer des demandes d'appui financier pour un projet plus ambitieux comprenant des souches provenant d'une large prospection.

2.4 Epidémiologie de la maladie Sud - Américaine des feuilles

Karine Gramacho propose d'étendre le réseau de stations d'observations épidémiologiques initialement prévues sur PMB à d'autres plantations à proximité d'Itabuna. Des étudiants co-encadrés par Karina, sous la tutelle du Prof. Maffia pourraient être chargés des observations. Selon les responsables du CEPEC, une unité d'épidémiologie existe à la CEPEC qui pourrait fournir des appareils de mesure. En 2005, une visite de Jean Guyot accompagné du Prof. Maffia permettrait de mieux apprécier la faisabilité d'une collaboration sur cette thématique.

Conclusion

Avec le soutien financier du MAE et de Michelin, les éléments indispensables à l'initiation dans de bonnes conditions du projet recherche d'ESTs dans l'interaction *hevea-Microcyclus* ont pu être rassemblés :

- les partenaires universitaires ont été approchés et d'une réflexion commune, un projet de recherche a été rédigé et reçu favorablement par la FAPESB ,
- une formation de deux mois au sein de l'équipe de Biotrop (Cirad-Montpellier) qui possède une grande expérience sur différents modèles végétaux, nous a permis d'adapter nos protocoles pour construire des banques orientées d'ADNc à partir de feuilles d'hévéa.

Il en résulte en fin 2004, mon affectation à l'université de Santa Cruz. Ce nouveau positionnement devrait permettre tout en assurant le suivi du programme d'amélioration conventionnel CMB, de développer de nouvelles formes de partenariat axées sur la recherche d'excellence, la formation et le montage de projets scientifiques avec les instituts locaux sur des approches moléculaires de l'interaction *Hevea - Microcyclus*.

Les résultats espérés sont :

- la création de 5 banques d'ADNc, permettant des études fonctionnelles pour une meilleure compréhension des mécanismes de résistance ;
- l'obtention de gènes différentiellement exprimés entre plantes résistantes et sensibles;
- le rapprochement des résultats de ceux obtenus par cartographie de la descendance PB 260 x MDF 180 ;
- la valorisation des résultats par des publications et des participations à des congrès

Bibliographie

Besse P., Seguin M., Lebrun P., Chevallier M.H., Nicolas D., Lanaud C. (1994) Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 88: 199-207.

Castro Filho A. S. (2003) Programa de desenvolvimento do agronegócio borracha no estado da Bahia -PRODEAB. 111p + anexas.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* Mar;8(3):175-85

Garcia D. 2003. Extension d'un réseau multilocal de clones d'hévéa dans l'Etat de l'Acre, Brésil : rapport de mission au Brésil du 12 au 16 octobre 2003. Montpellier, CIRAD-CP, 8-[10] p.

Le Guen V., Lespinasse D., Oliver G., Rodier-Goud M., Pinard F., Séguin M. 2003. Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. [On line]. *Theoretical and applied genetics*. vol.108:n 1 : p. 160-167.

Le Guen V., Rodier-Goud M., Troispoux V., Xiong T.C., Séguin M. 2004. Characterization of polymorphic microsatellite markers for *Microcyclus ulei*, causal agent of South American leaf blight of rubber trees. *Molecular ecology notes*. vol.4:n 1 : p. 122-124

Lespinasse D., Rodier-Goud M., Grivet L., Leconte A., Legnate H., Seguin M. (2000a) A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea spp.*) based on RFLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. *Theor. and Appl. Genet.* 100 : 127-138.

Lespinasse D., Grivet L., Troispoux V., Rodier-Goud M., Pinard F., Seguin M. (2000b) Identification of QTLs involved in the resistance of South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Theor. and Appl. Genet.* 100 : 975-984.

Sambugaro R., Furtado E.L., Rodella R.A., Mattos C.R.R (2004) Anatomia foliar de sseringueira (*Hevea spp.*) e desenvolvimento da infecção por *Microcyclus ulei*. *Summa Phytopathologica*. 30, 1: 51-56.

ANNEXES

Annexe 1

PROTOCOLES POUR LA CREATION DE BANQUES ORIENTEES D'ADNc PLEINE LONGUEUR DE FEUILLES D'HEVEA

I- EXTRACTION D'ARN (Méthode TRIzol, InVitrogen)

Préparer préalablement:

- CIAA (Chloroforme-Alcool Isoamylique, 24v:1v)
- Autoclaver pignons et mortiers ou les nettoyer au chloroforme.

- 1) Broyer l'échantillon au broyeur mécanique ou dans un mortier, à l'azote liquide. Au broyeur, utiliser 1 carré de feuilles de 2 x 2 cm, dans un tube de 2 ml, avec 2 billes de verre. 1 carré de 4 cm² = environ 50-60 mg (environ 100 ml de poudre après broyage ?).
- 2) Ajouter 1 ml de Trizol. Vortexer immédiatement et garder 5 min (maximum) à température ambiante (15 à 30°C).
- 3) Centrifuger 10 min, à 13.500 rpm, 5°C. Récupérer le surnageant.
- 4) Renouveler la centrifugation (élimination max des polysaccharides). Récupérer le surnageant.
- 5) Ajouter 200 µl (0.2v) de CIAA. Agiter vigoureusement à la main. 2-3 min à température ambiante.
- 6) Centrifugation 15 min, 12.000 g, 5°C. Récupérer la phase supérieure.
- 7) Ajuster 500 µl d' isopropanol. Agiter. Température ambiante 10 min.
- 8) Centrifuger à 12.000 g (maximum), 10 min, 5°C. Eliminer le surnageant.
- 9) Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70 %.
- 10) Centrifuger 7.500 g, 5 min à 5°C.
- 11) Sécher le culot à l'air (5 -10 min RT).
- 12) Dissoudre le culot d'ARN dans 20 µl d'eau Rnase-free.

II- SYNTHÈSE DE cDNA PAR RT- PCR: Méthode Creator™ SMART™ PCR cDNA Library Construction Kit (ClonTech)

II- 1- SYNTHÈSE DU PREMIER BRIN :

Dans un tube de 0.5 mL, additionner :

- 1-3 µL d'extrait d'ARN (0.05 – 1.0 µg d'ARN total),
- 1 µL de SMART IV oligonucleotide (12 µM),
- 1 µL de CDS III/3' PCR Primer,
- x µL d'eau stérile et désionisée pour un volume final de 5 µL.

Mélanger et centrifuger brièvement.

Incuber dans un bain sec à 72°C pendant 2 min.

Refroidir dans la glace 2 min.

Centrifuger brièvement.

Ajouter :

- 2 µL de 5 X First Strand Buffer,
- 1 µL DTT (20 mM),
- 1 µL de dNTP mix (10 mM),
- 1 µL PowerScript Reverse Transcriptase.

Mélanger doucement à la pipette et centrifuger brièvement.
Ajouter une goutte d'huile minérale et incubé 1 heure dans un BM à 42°C.

II- 2- SYNTHÈSE DU DEUXIÈME BRIN :

Préparer le mélange PCR :

- 80 µL d'eau PCR (ou eau désionisée),
- 10 µL de 10X Advantage 2 PCR Buffer,
- 2 µL de 50X dNTP mix,
- 2 µL de 5' PCR Primer ,
- 2 µL de CDS III/3' PCR Primer,
- 2 µL de 50X Advantage 2 polymerase Mix,
- 2 µL d'échantillon (en dernier).

Mélanger à la pipette.

Ajouter une goutte d'huile minérale.

PCR :

95°C pendant 1 min

24 cycles : 95°C pendant 15 s
 68°C pendant 6 min

72°C pendant 8 min
15°C

Contrôler l'amplification des cDNA sur gel d'agarose 1 % en TAE en déposant 5 µL d'échantillon additionné de 0.5 µL de bleu agarose 10X + Ladder 1 Kb.

III – PROTEINASE K DIGESTION

Le traitement à la Proteinase K est nécessaire pour inactiver la DNA polymérase.

- 1) Dans un tube stérile de 0.5 ml déposer 50 µL d'ADNc (2-3 µg).
- 2) Ajouter 2 µL de proteinase K (20 µg/µL) .
- 3) Mélanger et centrifuger rapidement .
- 4) Incuber à 45°C pendant 20 min. Centrifuger rapidement .
- 5) Ajouter 50 µL d'eau désionisée.
- 6) Ajouter 100 µL de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (saturé en Tris pH 7.8) et mélanger par inversion pendant 1-2 min.
- 7) Centrifuger à 14.000 rpm pendant 5 min pour séparer les phases.
- 8) Récupérer la phase supérieure dans un tube 0.5 ml.
- 9) Ajouter 100 µL de chloroforme :alcool isoamylique. Mélanger par inversion 1-2 min.
- 10) Centrifuger à 14.000 rpm pendant 5 min.
- 11) Récupérer la phase supérieure dans un tube de 0.5 ml.

- 12) Ajouter 10 μL de Sodium Acétate (3M), 1.3 de glycogène (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) et 260 μL d'éthanol 95 %. Centrifuger immédiatement à 14.000 rpm pendant 20 min à température ambiante.
- 13) Eliminer le surnageant.
- 14) Laver le culot avec 100 μL d'éthanol (70 %).
- 15) Sécher le culot.
- 15) Ajouter 79 μL d'eau désionisée.

IV – Sfi DIGESTION

- 1) Mélanger les solutions suivantes dans un nouveau tube de 0.5 ml :

- 79 μL ADNc
- 10 μL 10X Sfi Buffer
- 10 μL Sfi I Enzyme
- 1 μL 100X BSA

- 2) Bien mélanger. Incuber le tube à 50°C pendant 2 h.

V – FRACTIONNEMENT DES INSERTS PAR TAILLE SUR COLONNE D'EXCLUSION type CHROMA SPIN-400 Column (Creator™ SMART™ DNA library Construction Kit – Clontech)

- 1) Préparer 16 tubes de 1.5 mL notés de 1 à 16 et rangés sur un portoir.
- 2) Resuspendre le gel de la colonne CHROMA SPIN-400 par retournement.
- 3) Ouvrir la colonne par le haut et resuspendre doucement le gel avec une pipette 1000 μL en évitant de générer des bulles d'air, placer la colonne sur un portoir.
- 4) Ouvrir le bouchon du bas et laisser couler le liquide jusqu'à la marque 1 mL, si la matrice de la colonne est inférieure à 1 mL, faire le niveau avec la matrice d'une autre colonne. Les gouttes doivent tomber toutes les 40 à 60 secondes (environ 40 μL /goutte), si les gouttes tombent trop lentement (100 sec) ou sont trop petites (25 μL), resuspendre entièrement la matrice.
- 5) Quand tout le tampon est drainé, remplir doucement la colonne le long de la paroi avec 700 μL de tampon « Column buffer ».
- 6) Quand tout le tampon est sorti (15 à 20 min), placer 45 μL (100 μL maxi) d'amplification cDNA additionner délicatement de 100 μL de tampon (Column buffer), laisser couler totalement.
- 7) Placer la colonne au-dessus du portoir contenant les 16 tubes et additionner 600 μL de tampon (Column buffer). Recueillir une goutte (fraction) par tube.
- 8) Contrôler les fractions sur gel agarose/ TAE 1 % en déposant 6 μL de chaque fraction additionné de 0.6 μL de bleu agarose 10X. Révéler au Bromure d'éthidium (BET).
- 9) Rassembler les fractions (3 à 4 maxi = 105 à 140 μL) qui ont des tailles de cDNA intéressantes.

10) Précipiter les cDNA de ce pool en additionnant :

- 1/10 vol d'acétate de sodium (3M pH 5.2),
- 1.3 μ L de glycogène (20 mg/mL),
- 2.5 vol d'éthanol à 95 %.

11) Mélanger doucement par retournement du tube.

12) Placer le tube à -80°C pendant 1 heure (ou -20°C pendant une nuit pour un meilleur résultat).

13) Centrifuger le tube à 14.000 rpm pendant 20 min à température ambiante.

14) Retirer le surnageant délicatement avec une pipette.

15) Centrifuger brièvement pour pouvoir enlever tout le liquide restant.

16) Laisser sécher la pelote pendant 10 min environ.

17) Reprendre la pelote dans 20 μ L d'eau stérile.

VI- LIGATION DES ADNc DANS pDNR-LIB

Dans un tube 0.5 ml, on additionne :

- 1 μ L d'ADNc
- 1 μ L pDNR-LIB (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- 0.5 μ L ATP (10 mM)
- 0.5 μ L T4 DNA ligase
- 1.5 μ L d'eau désionisée

Incuber une nuit à 16°C .

Il est conseillé de faire un témoin avec :

- 1 μ L d'ADNc
- 1 μ L pDNR-LIB (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- 0.5 μ L ATP (10 mM)
- 0.5 μ L T4 DNA ligase
- 1.5 μ L d'eau désionisée

VII- TRANSFORMATION DES PLASMIDES DANS XL1-Blue (Stratagene ref 200236)

Préparer les milieux de culture dans des grandes boîtes rondes 140 x 20 mm prévues pour 100 mL de milieu (mais en couler moins).

Dans 500 mL de milieu LB* autoclavé (121°C , 15 min) et tiède, additionner :

- 125 μ L d'ampicilline (200 mg/mL)
- 400 μ L X GAL (20 mg/mL)
- 500 μ L d'IPTG (200 mg/mL)

Mélanger et couler le milieu dans les boîtes.

Mettre le bain-Marie à préchauffer à 42°C .

Transférer un tube de bactéries 0.2 mL de – 80°C à – 20°C au moins une heure avant. Dix minutes avant la manipulation les transférer sous la hotte bactériologie dans un portoir – 20°C.

VII-1- TRANSFORMATION PAR CHOC THERMIQUE

Dans un tube flacon de 15 mL (réf. 2059) mettre 40 µL de suspension d'XL1Blue, ajouter 0.7 µL de mercaptoéthanol.

Laisser 10 min dans la glace en agitant doucement toutes les 2 min.

Ajouter 2 µL de ligation, agiter doucement (Faire un témoins avec 0.5 µL de PUC).

Laisser 30 min dans la glace sans agiter.

Faire le choc thermique à 42°C, 45 s (très précisément).

Remettre 2 min dans la glace.

Ajouter 450 µL de SOC et mettre à 37°C sous agitation (200 tr/min) pendant 1 heure.

Étaler 100 µL par boîte et (40 µL pour le pUC control DNA).

Mettre en culture la nuit dans une étuve à 37°C.

VII-2- TRANSFORMATION PAR ELECTROPORATION

Les bactéries ElectroMAX™ DH10B™ T1 Phage Resistant Cells sont utilisées pour réaliser des transformation par électroporation.

Ajouter 20 µL de ElectroMAX™ DH10B™ T1 Phage Resistant Cells à 0.5 – 1 µL de ligation.

Pour l'électroporateur présent au Cirad, les paramètres suivants ont été retenus :

- la cuve d'électroporation est maintenue dans la glace ;
- 4 kΩ, 330 µF capacitance, Fast ;
- charger jusqu'à 400, armer (ARM) et déclencher (TRIGGER) ;
- l'indicateur « Voltage booster » ne doit pas dépasser 2,4.

Les cellules transformées dans la cuvette sont récupérées avec 1 ml de milieu S.O.C et transférées dans un tube de 15 ml à bouchon à vis.

Agiter à 225 rpm (37°C) pendant 1 h.

Diluer les cellules transformées avec le pUC control DNA 1:100 avec le milieu S.O.C.

Étaler 100 µL par boîte pour les échantillons et 40 µL pour le pUC control DNA.

Mettre en culture la nuit dans une étuve à 37°C.

* 30g de milieu LB (Tryptone 10g, Yeast Extract 5g, Sodium Chloride 10g, Microbiological tested Agar 10g) pour 1 litre de milieu, pH 7.0

VIII- ANALYSE DES CLONES POSITIFS

VIII-1- ANALYSE DES CLONES PAR AMPLIFICATION DES INSERTS CLONES

(Conditions appliquées lors du stage correspondant aux résultats de la photo 4)

Culture bactérienne*	1	µl
Tampon 10X	2	µl
MgCl2 50 mM	0.2	µl

dNTP 10 mM	2	µl
Amorce T7 100 µM	0.2	µl
Amorce SP6 100 µM	0.2	µl
Taq DNA Polymerase	1	µl
H2O qsp 20 µl	13.4	µl

* ou inoculation directe de la colonie bactérienne dans la mélange réactionnel de la PCR à l'aide d'une pointe de cure dent.

- 30 cycles :
- 94°C pendant 4 min
 - 93°C pendant 30 s
 - 50°C pendant 45 s
 - 72°C pendant 4 min
 - 72°C pendant 7 min
 - 6°C

Autre méthode appliquée sur Cacao

Travailler sous hotte bactériologique.

Préparer des plaques PCR 96 puits, avec 15 µL d'eau Merck filtrée à 0.25 µ par puit (seringue).

Avec un cure dent, prélever des bactéries blanches, tremper le cure-dent dans l'eau.

Procéder ligne par ligne. A la fin de la ligne, enlever et jeter les cure-dent dans poubelle bactério.

Lorsque la plaque est pleine, repiquer les 96 bactéries sur une grande boîte LB + Amp^r + Xgal + IPTG (avec repiquoir 96 pointes).

Mettre en culture la nuit à 37°C.

On considère qu'il reste 10 µL de suspension bactérienne par puits.

Mix PCR pour une réaction (15 µL):

- 2.5 µL de Tampon 10X
- 0.25 µL de MgCl₂ à 50 mM
- 2 µL de dNTP
- 0.5 µL d'amorce SP6 à 10 µM (0.2 µM final)
- 0.5 µL d'amorce T7 à 10 µM (0.2 µM final)
- 8.55 µL d'eau Merck
- 0.7 µL de Taq (maison)

Aliquoter 15 µL de mix par puit, additionné d'une goutte d'huile minérale.

Lancer la PCR sur le programme SOND SAT :

- 30 cycles:
- 94°C pendant 4 min
 - 94°C pendant 30 s
 - 52°C pendant 45 s
 - 72°C pendant 4 min
 - 72°C pendant 8 min
 - 6°C

Vérification sur gel d'agarose / TAE à 1 %, migration 120 volts pendant 1 heure 30, déposer 15 µL d'amplificat + 1.5 µL de bleu agarose 10X.

VIII-2- ANALYSE DES CLONES PAR PURIFICATION ET DIGESTION DES PLASMIDES

VIII-2-1- Miniprep Lyse Alcaline

Repiquage des colonies dans des tubes de 2 mL contenant 1,5 mL de milieu LB + ampicilline.

Incubation à 37°C sous agitation (200 tr/min) 24 h.

Centrifuger les tubes 30 sec à 14.000 rpm à température ambiante, jeter le surnageant.

Suspendre les culots dans 100 µL P1 ou BDI.

Ajouter 200 µL de P2 et mélanger en retournant 3 à 6 fois les tubes (ne pas vortexer).

Laisser incuber 5 min à température ambiante.

Ajouter 150 µL de P3; mélanger doucement en retournant 3 à 6 fois les tubes.

Incuber 5 min dans la glace (un précipité flocculent apparaît).

Centrifuger à 14.000 rpm pendant 5 min à froid.

1^{ère} option : pas de purification .

Récupérer le surnageant et rajouter 1ml d'éthanol absolu ou 400 µl d'isopropanol.

Centrifuger 10 min et éliminer le surnageant.

Rajouter 1 ml d'éthanol 70 %.

Centrifuger 10 min et éliminer le surnageant.

Sécher quelques minutes au speed vac.

Reprendre le culot dans 50 µl H₂O + 0.5 µl RNase 10 mg/ml.

L'analyse de l'ADN sera réalisée sur 3 µl.

2^{ème} option : purification sur filtre (Quiagene ou Promega Wizard Plus.

Transférer le surnageant dans les High Pure filter tube, placés dans les Collection tubes.

Centrifuger 30 à 60 secondes à 14.000 rpm.

Déconnecter le filtre et jeter le filtrat, reconnecté sur le même tube.

Ajouter 700 µL de Wash buffer II.

Centrifuger 30 à 60 secondes à 14.000 rpm.

Déconnecter le filtre jeter le filtrat et reconnecter le filtre.

Centrifuger une deuxième fois 30 à 60 secondes à 14.000 rpm et jeter le filtrat.

Placer le filtre sur un tube eppendorf de 1.5 mL et ajouter 100 µL d' Elution buffer.

Centrifuger 30 sec à 14.000 rpm.

Les tubes contiennent l'élua de plasmides purifiés.

Composition des tampons :

BDI : 25 mM Tris HCl pH8.0 ; EDTA 10 mM, glucose 50 mM.

P1 : 50 mM Tris/HCl ; 10 mM EDTA, pH8.0. Dissoudre 6,055 g Tris base, 3,722 g EDTA 2H₂O dans 800 ml d'eau. Ajuster le pH à 8.0 avec HCl. Laisser refroidir avant de finir d'ajuster le pH. Ajuster le volume à 1 litre. Conserver à 4°C.

P2 : 200 mM NaOH, 1% SDS. Mélanger 100 ml de NaOH, 0.4M avec 20 ml d'une solution de SDS à 10 %, qsp 200 ml H₂O. Conserver à l'obscurité à température ambiante.

VIII-2-2- Digestion des plasmides pour sortir les inserts

Mix de digestion :

- 7 μL de plasmides
- 2 μL de tampon enzyme 10X
- 1 μL d'enzyme NOT 1 (rare chez les végétaux)
- 10 μL d'eau Merck

Incubation dans un bain-marie 1 heure 30 min à 37°C.

Dans les tubes (20 μL) , ajouter 2 μL de bleu agarose 10X aux échantillons.

Incuber 5 min à 65°C dans un bain sec pour dérouler les plasmides.

Déposer 20 μL d'échantillons et 7 μL de marqueur de taille 1Kb.

Electrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % en TAE, migration 1 heure 30 à 80 volts.

Annexe 2
Programme du stage
« Initiation à la bioinformatique »

1. Les bases de données sur le Web :

- 1.1. Les bases de séquences, de motifs, de structures, de références bibliographiques. Accès aux données du NCBI ou de EMBL. Utilisation de SRS.
- 1.2. Comment retrouver une information dans les bases de données du Web (un contig, un chromosome, un gène, etc... ? Liens entre cartes génétiques et cartes physiques. L'exemple de Gramene.
- 1.3. Outils de visualisation : comment retrouver l'information sur les annotations ? Génome Browser. Les outils du TIGR.

2. Logiciels d'alignement

- 2.1. Les alignements par paire (alignement globaux et locaux). Les matrices de similitude entre acides aminés, les insertions et délétions, les limites des programmes classiques, le dotplot. Evaluation statistique des résultats. Alignement d'une séquence protéique avec une séquence nucléotidique. Recherche de frameshifts.
- 2.2. Les alignements multiples, Clustal W et Dialign.

3. Notions simples de classification de séquences (méthode de distances et méthode du maximum de vraisemblance ; comparaison d'arbres). Phylogénie moléculaire.
4. Logiciels d'alignement – les recherches de similitudes dans les banques avec Blast et Fasta.

5. Les serveurs – notions nécessaires pour l'utilisation d'Unix, telnet, ftp, etc ...

6. Des exemples d'application sous Unix.

- 6.1. Nettoyer des séquences.
- 6.2. Comment faire pour traiter des séquences en batch ?
- 6.3. Comment stocker les séquences ?
- 6.4. Comment stocker les résultats d'interrogation blast ?

15 MARS 2005